



(21)申请号 201610512711.6

(22)申请日 2016.06.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106124783 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(73)专利权人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518172 广东省深圳市龙岗区宝龙街道宝龙二路亚辉龙生物科技厂区1栋

(72)发明人 钱纯亘 邹定标 王刚 黄丕浓 夏福臻

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司 44224

代理人 徐春祺

(51)Int.Cl.

G01N 33/92(2006.01)

G01N 33/571(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

(56)对比文件

CN 102565405 A,2012.07.11,

CN 103193976 A,2013.07.10,

CN 1714095 A,2005.12.28,

CN 103059288 A,2013.04.24,

CN 102575244 A,2012.07.11,

CN 103298949 A,2013.09.11,

CN 101360997 A,2009.02.04,

审查员 王晓媛

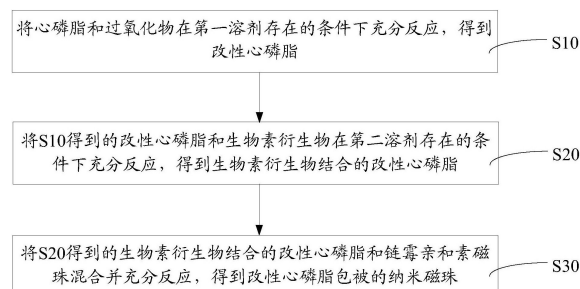
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

改性心磷脂包被的纳米磁珠及其制备方法

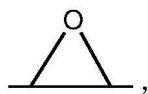
(57)摘要

本发明公开了一种改性心磷脂包被的纳米磁珠及其制备方法,改性心磷脂包被的纳米磁珠包括:改性心磷脂、生物素衍生物和链霉亲和素磁珠;改性心磷脂与生物素衍生物通过-CO-NH-结构从而连接到一起;链霉亲和素磁珠为结合了链霉亲和素的纳米磁珠,生物素衍生物和链霉亲和素连接。这种改性心磷脂包被的纳米磁珠通过化学键直接将改性心磷脂牢固与生物素衍生物牢固的连接,生物素衍生物和链霉亲和素磁珠表面的链霉亲和素连接。这种改性心磷脂包被的纳米磁珠可以直接用于抗磷脂抗体的检测,并且相对于传统物理吸附心磷脂的方法制备的检测产品,具有较高的稳定性。

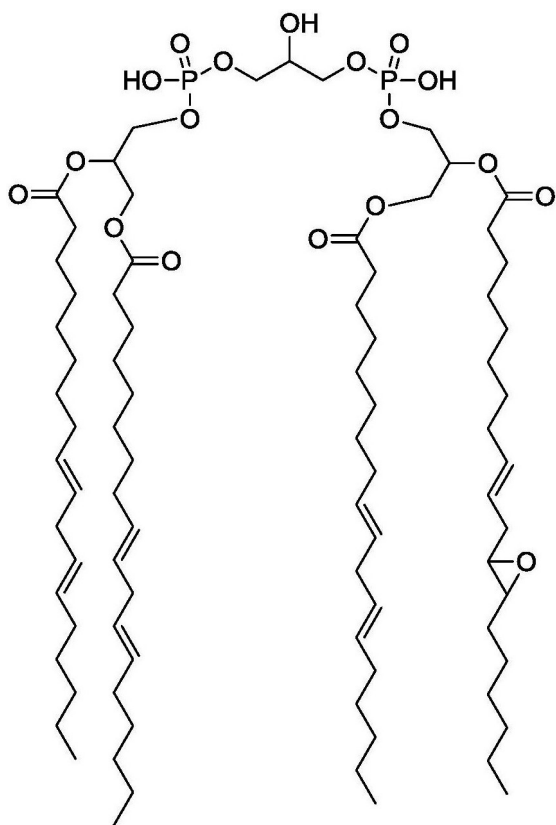


1. 一种改性心磷脂包被的纳米磁珠,其特征在于,包括:改性心磷脂、生物素衍生物和链霉亲和素磁珠;

所述改性心磷脂为心磷脂的疏水性脂肪酸侧链被氧化得到,所述改性心磷脂含有一个

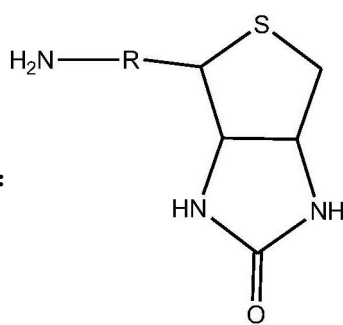


所述改性心磷脂的结构式如下:

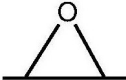


;

所述生物素衍生物的结构式为:



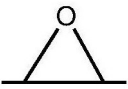
其中,所述-R-为-(CH₂)₆-,所

述改性心磷脂中的  与所述生物素衍生物中的-NH₂生成-CO-NH-结构从而将所述改性心磷脂和所述生物素衍生物连接到一起;

所述链霉亲和素磁珠为结合了链霉亲和素的纳米磁珠,所述生物素衍生物和所述链霉亲和素连接。

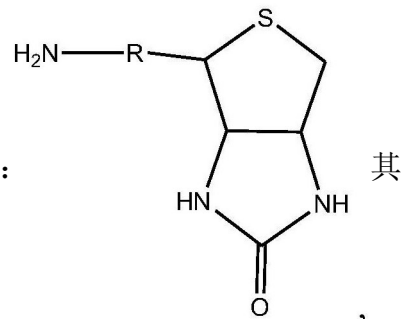
2. 一种权利要求1所述的改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

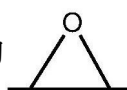
将心磷脂和过氧化物在第一溶剂存在的条件下充分反应,得到改性心磷脂,其中,所述

改性心磷脂的疏水性脂肪酸侧链被氧化,所述改性心磷脂含有 , 所述过氧化物为过氧苯甲酸、间氯过氧苯甲酸、过氧乙酸或过氧丙酸,所述第一溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、氯仿、苯或甲苯;

将所述改性心磷脂和生物素衍生物在第二溶剂存在的条件下充分反应,得到生物素衍

生物结合的改性心磷脂,其中,所述生物素衍生物的结构式为:



中,所述-R-为 $-(CH_2)_6-$,所述改性心磷脂中的  与所述生物素衍生物中的 $-NH_2$ 生成 $-CO-NH-$ 结构从而将所述改性心磷脂和所述生物素衍生物连接到一起,所述第二溶剂为DMSO、DMF、四氢呋喃或pH为6.5~8.5的磷酸盐缓冲液;以及

将所述生物素衍生物结合的改性心磷脂和链霉亲和素磁珠混合并充分反应,得到改性心磷脂包被的纳米磁珠,其中,所述链霉亲和素磁珠为结合了链霉亲和素的纳米磁珠,所述生物素衍生物和所述链霉亲和素连接。

3. 根据权利要求2所述的改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,其特征在于,所述将心磷脂和过氧化物在第一溶剂存在的条件下充分反应的操作中,所述心磷脂和所述过氧化物的摩尔比为1:1~8。

4. 根据权利要求2所述的改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,其特征在于,所述将所述改性心磷脂和生物素衍生物在第二溶剂存在的条件下充分反应的操作中,所述改性心磷脂与所述生物素衍生物的摩尔比为1:1.5~20。

5. 根据权利要求2所述的改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,其特征在于,所述将所述生物素衍生物结合的改性心磷脂和链霉亲和素磁珠混合并充分反应的操作中,所述生物素衍生物结合的改性心磷脂的浓度为0.1mg/mL~1mg/mL,所述链霉亲和素磁珠的浓度为5mg/mL~15mg/mL。

改性心磷脂包被的纳米磁珠及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测领域,尤其涉及一种改性心磷脂包被的纳米磁珠及其制备方法。

背景技术

[0002] 抗心磷脂抗体是一种能与多种含有磷脂结构的抗原物质发生反应的抗体,抗原为参与多种细胞膜组成的带负电荷的磷脂成分。临床上主要存在于抗磷脂综合征、各种自身免疫性疾病和梅毒感染患者体内。

[0003] 抗磷脂综合征(APS)包括多种自身性免疫性疾病,多见于年轻人,男女发病比率约为2:8。患者可出现一种或多种表现,可累及多个系统、器官,主要有:静脉和动脉血栓形成、血小板减少症、习惯性流产、心肌病、心脏病、大脑和肾脏梗塞、肺高压。恶性APS可表现为短期内进行性广泛血栓形成,造成多器官功能衰竭甚至死亡。可继发于系统性红斑狼疮或者其它自身免疫病,但也可单独出现(原发抗磷脂综合征)。

[0004] 梅毒患者体内也能产生抗磷脂抗体,梅毒是由螺旋体细菌梅毒密螺旋体引起的性传播疾病。据报道,每年有超过5百万人感染梅毒,其中包括通过先天性传染的3万名婴儿。梅毒可于患者体内潜伏和隐藏许多年,并可导致各种各样的临床表现。其中处于梅毒隐藏期的患者并无临床症状,次阶段在约三分之二未治疗病人中持续终生。感染者在隐藏期不具有传染性,然而处于隐藏期的母亲所生的孩子可能感染先天性梅毒。

[0005] 抗磷脂抗体检测试验被广泛应用于磷脂综合征诊断以及梅毒的非密螺旋体试验。该检测具有廉价、快速和方便对大量样本执行的优点。此外,由于抗磷脂抗体的浓度会随着梅毒的治疗成功而逐渐降低,而梅毒感染的特异性抗体密螺旋体抗体会持续数年甚至终生都高。因此抗磷脂抗体检测试验被认为是监测梅毒治疗的更好选择。

[0006] 传统的检测抗磷脂抗体的主要方法是心磷脂用物理吸附的方式涂抹在特定的固体如酶标板上,然后利用附着在酶标板上面的心磷脂与待检测样本中的抗磷脂抗体结合,实现对样本中的抗磷脂抗体的捕获。通过对捕获的抗磷脂抗体显色并测定发光浓度,就能间接的读取样本中的抗磷脂抗体浓度。

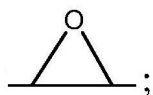
[0007] 由于用物理吸附方式固定的心磷脂在溶剂、加热等外部条件影响下容易从固体板上解离和脱落,因此通过该方法制备的检验产品的稳定性较差。

发明内容

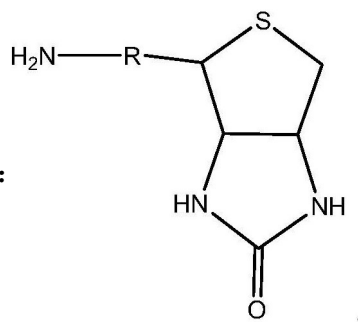
[0008] 基于此,有必要提供一种用于检测抗心磷脂抗体的稳定性较好的改性心磷脂包被的纳米磁珠及其制备方法。

[0009] 一种改性心磷脂包被的纳米磁珠,包括:改性心磷脂、生物素衍生物和链霉亲和素磁珠;

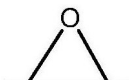
[0010] 所述改性心磷脂为心磷脂的疏水性脂肪酸侧链被氧化得到,所述改性心磷脂含有



[0011] 所述生物素衍生物的结构式为：



其中,所述-R-为含有4

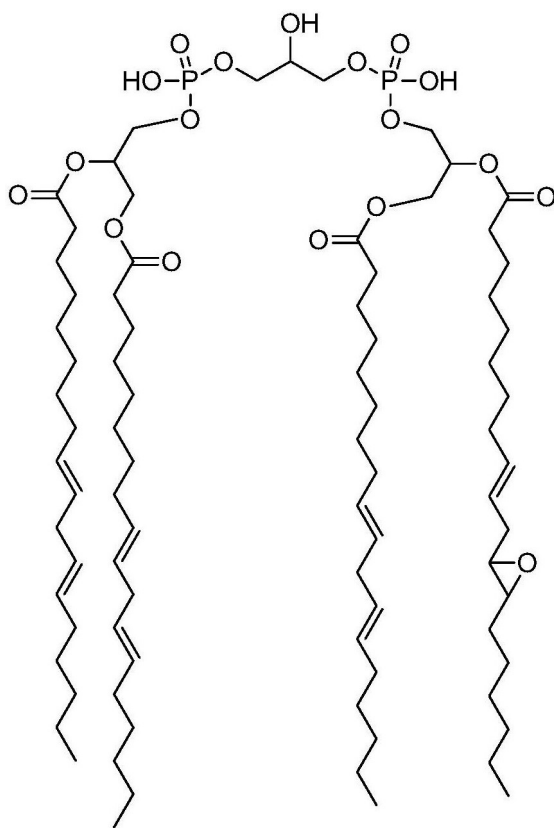
个~20个碳原子的饱和烷基链或含有2个~10个碳原子的聚乙二醇链,所述改性心磷脂中的  与所述生物素衍生物中的-NH₂生成-CO-NH-结构从而将所述改性心磷脂和所述生物素衍生物连接到一起;

[0012] 所述链霉亲和素磁珠为结合了链霉亲和素的纳米磁珠,所述生物素衍生物和所述链霉亲和素连接。

[0013] 在一个实施例中,所述-R-为含有4个~10个碳原子的饱和烷基链。

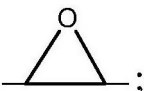
[0014] 在一个实施例中,所述改性心磷脂含有一个 。

[0015] 在一个实施例中,所述改性心磷脂的结构式如下:



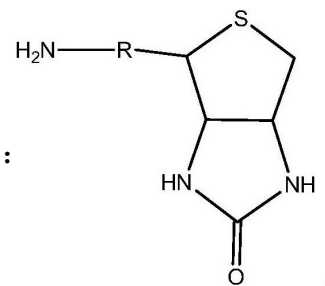
[0016]

[0017] 一种上述的改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,包括如下步骤:

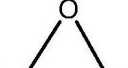
[0018] 将心磷脂和过氧化物在第一溶剂存在的条件下充分反应,得到改性心磷脂,其中,所述改性心磷脂的疏水性脂肪酸侧链被氧化,所述改性心磷脂含有  ;

[0019] 将所述改性心磷脂和生物素衍生物在第二溶剂存在的条件下充分反应,得到生物

素衍生物结合的改性心磷脂,其中,所述生物素衍生物的结构式为:



其中,所述-R-为含有4个~20个碳原子的饱和烷基链或含有2个~10个碳原子的聚乙二醇

链,所述改性心磷脂中的  与所述生物素衍生物中的-NH₂生成-CO-NH-结构从而将

所述改性心磷脂和所述生物素衍生物连接到一起;以及

[0020] 将所述生物素衍生物结合的改性心磷脂和链霉亲和素磁珠混合并充分反应,得到改性心磷脂包被的纳米磁珠,其中,所述链霉亲和素磁珠为结合了链霉亲和素的纳米磁珠,所述生物素衍生物和所述链霉亲和素连接。

[0021] 在一个实施例中,所述将心磷脂和过氧化物在第一溶剂存在的条件下充分反应的操作中,所述过氧化物为过氧苯甲酸、间氯过氧苯甲酸、过氧乙酸或过氧丙酸,所述心磷脂和所述过氧化物的摩尔比为1:1~8。

[0022] 在一个实施例中,所述将心磷脂和过氧化物在第一溶剂存在的条件下充分反应的操作中,所述第一溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、氯仿、苯或甲苯。

[0023] 在一个实施例中,所述将所述改性心磷脂和生物素衍生物在第二溶剂存在的条件下充分反应的操作中,所述第二溶剂为DMSO、DMF、四氢呋喃或pH为6.5~8.5的磷酸盐缓冲液。

[0024] 在一个实施例中,所述将所述改性心磷脂和生物素衍生物在第二溶剂存在的条件下充分反应的操作中,所述改性心磷脂与所述生物素衍生物的摩尔比为1:1.5~20。

[0025] 在一个实施例中,所述将所述生物素衍生物结合的改性心磷脂和链霉亲和素磁珠混合并充分反应的操作中,所述生物素衍生物结合的改性心磷脂的浓度为0.1mg/mL~1mg/mL,所述链霉亲和素磁珠的浓度为5mg/mL~15mg/mL。

[0026] 这种改性心磷脂包被的纳米磁珠通过化学键直接将改性心磷脂牢固与生物素衍生物牢固的连接,生物素衍生物和链霉亲和素磁珠表面的链霉亲和素连接,相对于物理吸附的方式,更加易于控制磁珠表面的改性心磷脂量,并且可以通过调节-R-的长度,实现改性心磷脂量与纳米磁珠之间的距离的控制,更好的保留了改性心磷脂量与抗磷脂抗体结合的空间。这种改性心磷脂包被的纳米磁珠可以直接用于抗磷脂抗体的检测,并且相对于传统物理吸附心磷脂的方法制备的检测产品,具有较高的稳定性。

附图说明

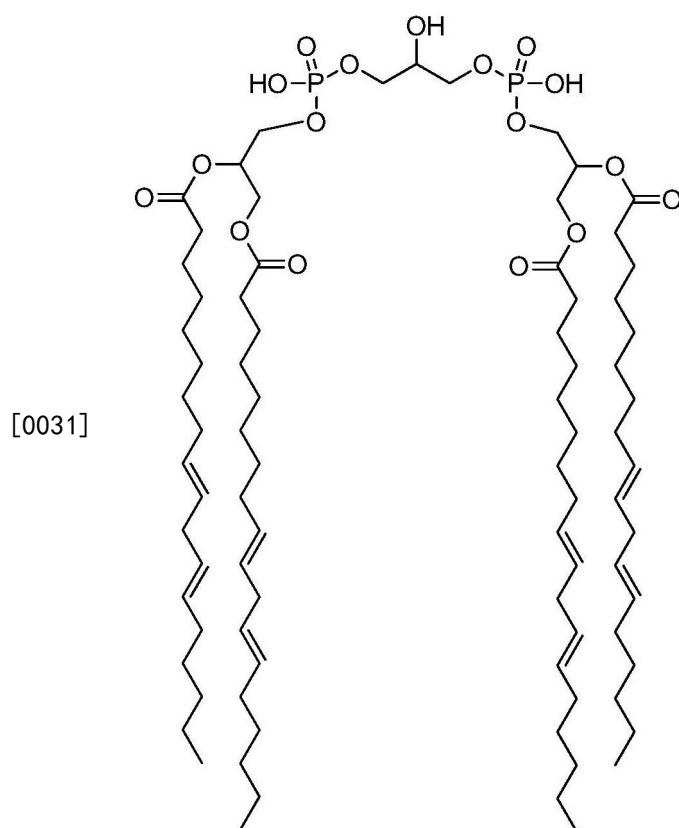
[0027] 图1为一实施方式的改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法的流程图。

具体实施方式

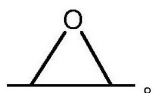
[0028] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进,因此本发明不受下面公开的具体实施的限制。

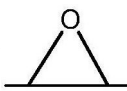
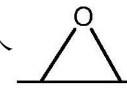
[0029] 一实施方式的改性心磷脂包被的纳米磁珠,包括:改性心磷脂、生物素衍生物和链霉亲和素磁珠。

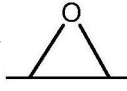
[0030] 心磷脂是由3个甘油、2个磷酸以及4个长链不饱和烷基构成的酯类物质,该结构含有2个亲水性中心以及4条疏水性侧链。心磷脂的结构式如下:



[0032] 改性心磷脂为心磷脂的疏水性脂肪酸侧链被氧化得到,改性心磷脂含有

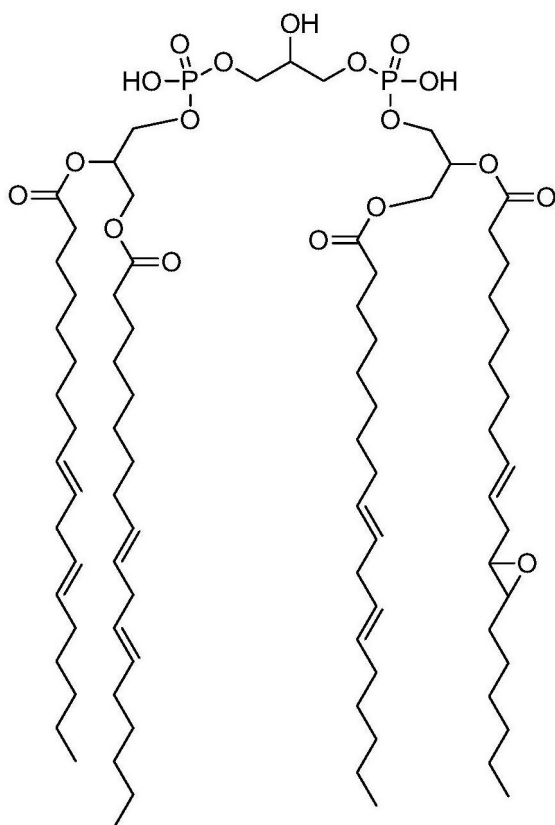


[0033] 由于心磷脂有4条侧链,心磷脂改性时4条侧链可以同时被氧化,因此该改性心磷脂可能包含多个 。具体来说,该改性心磷脂可以包含1个~8个 。

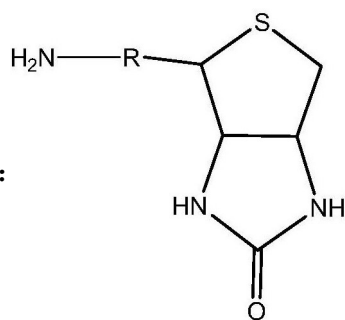
[0034] 优选的,改性心磷脂含有一个 。

[0035] 特别优选的,改性心磷脂的结构式如下:

[0036]

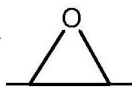


[0037] 生物素衍生物的结构式为：



[0038] 其中，-R-为含有4个~20个碳原子的饱和烷基链或含有2个~10个碳原子的聚乙二醇链。

[0039] 改性心磷脂中的



与生物素衍生物中的-NH₂生成-CO-NH-结构从而将改性心磷脂和生物素衍生物连接到一起。

[0040] 优选的，-R-为含有4个~10个碳原子的饱和烷基链。

[0041] 特别优选的，-R-为-(CH₂)₆-。

[0042] 由于心磷脂分子的尺寸非常小，可改造的空间严重不足，对亲水性的磷酸酯中心进行修饰会降低心磷脂与抗磷脂抗体的亲和性，甚至使抗原活性消失。

[0043] 这种改性心磷脂包被的纳米磁珠通过对心磷脂疏水性侧链进行改造，保留了心磷脂亲水性磷酸酯中心的改性心磷脂。

[0044] 这种改性心磷脂包被的纳米磁珠通过化学键直接将改性心磷脂牢固与生物素衍生物牢固的连接，生物素衍生物和链霉亲和素磁珠表面的链霉亲和素连接，相对于物理吸附的方式，更加易于控制磁珠表面的改性心磷脂量，并且可以通过调节-R-的长度，实现改

性心磷脂量与纳米磁珠之间的距离的控制,更好的保留了改性心磷脂量与抗磷脂抗体结合的空间。这种改性心磷脂包被的纳米磁珠可以直接用于抗磷脂抗体的检测,并且相对于传统物理吸附心磷脂的方法制备的检测产品,具有较高的稳定性。

[0045] 此外,由于每个链霉亲和素能与4个生物素紧密结合,这种改性心磷脂包被的纳米磁珠通过生物素-链霉亲和素放大效应,使被检测信号放大了4倍,极大的提高了抗磷脂抗体的检测灵敏度。

[0046] 如图1所示的上述改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,包括如下步骤:

[0047] S10、将心磷脂和过氧化物在第一溶剂存在的条件下充分反应,得到改性心磷脂。

[0048] 通过心磷脂与过氧化物反应,对心磷脂的脂肪酸侧链进行氧化。

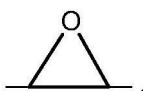
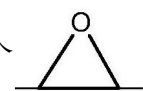
[0049] 过氧化物为过氧苯甲酸、间氯过氧苯甲酸、过氧乙酸或过氧丙酸。

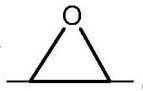
[0050] 心磷脂和过氧化物的摩尔比为1:1~8。

[0051] 第一溶剂为二氯甲烷、三氯甲烷、氯仿、苯或甲苯。

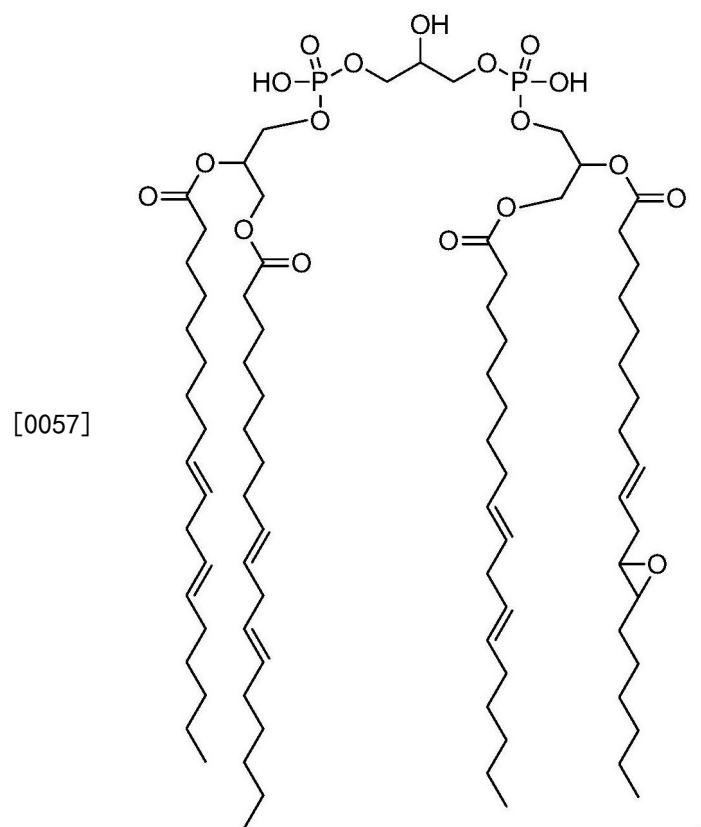
[0052] S10还包括对中间产物进行纯化的操作,纯化可以为乙酸乙酯萃取后经过液相制备色谱纯化。纯化后可以得到纯度约80%的改性心磷脂。

[0053] S10中,反应温度为60℃~100℃。

[0054] 由于心磷脂有4条侧链,心磷脂改性时4条侧链可以同时被氧化,因此该改性心磷脂可能包含多个 。具体来说,改性心磷脂可以包含1个~8个 。

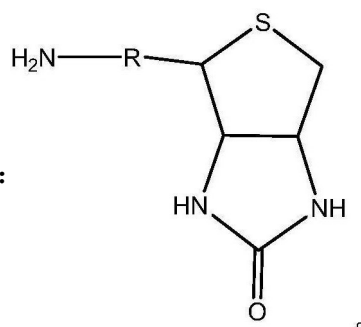
[0055] 优选的,改性心磷脂含有一个 。

[0056] 特别优选的,改性心磷脂的结构式如下:

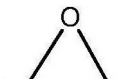


[0058] S20、将S10得到的改性心磷脂和生物素衍生物在第二溶剂存在的条件下充分反应,得到生物素衍生物结合的改性心磷脂。

[0059] 生物素衍生物的结构式为:



[0060] 其中,-R-为含有4个~20个碳原子的饱和烷基链或含有2个~10个碳原子的聚乙二醇链。

[0061] 改性心磷脂中的  与生物素衍生物中的-NH₂生成-CO-NH-结构从而将改性心磷脂和生物素衍生物连接到一起。

[0062] 优选的,-R-为含有4个~10个碳原子的饱和烷基链。

[0063] 特别优选的,-R-为-(CH₂)₆-。

[0064] 生物素衍生物可以直接购买得到。

[0065] S20中,第二溶剂为DMSO、DMF、四氢呋喃或pH为6.5~8.5的磷酸盐缓冲液。

[0066] S20中,改性心磷脂与生物素衍生物的摩尔比为1:1.5~20。

[0067] S30、将S20得到的生物素衍生物结合的改性心磷脂和链霉亲和素磁珠混合并充分反应,得到改性心磷脂包被的纳米磁珠。

[0068] 链霉亲和素磁珠为结合了链霉亲和素的纳米磁珠,生物素衍生物和链霉亲和素连接。

[0069] 链霉亲和素磁珠可以为直接购买,例如,购自MagnaBind公司(货号为21344)。

[0070] 将生物素衍生物结合的改性心磷脂和链霉亲和素磁珠混合并充分反应的操作中,生物素衍生物结合的改性心磷脂的浓度为0.1mg/mL~1mg/mL,链霉亲和素磁珠的浓度为5mg/mL~15mg/mL。

[0071] 这种改性心磷脂包被的纳米磁珠的制备方法,通过化学键直接将改性心磷脂牢固与生物素衍生物牢固的连接,生物素衍生物和链霉亲和素磁珠表面的链霉亲和素连接,相对于物理吸附的方式,更加易于控制磁珠表面的改性心磷脂量,并且可以通过调节-R-的长度,实现改性心磷脂量与纳米磁珠之间的距离的控制,更好的保留了改性心磷脂量与抗磷脂抗体结合的空间。制得的改性心磷脂包被的纳米磁珠可以直接用于抗磷脂抗体的检测,并且相对于传统物理吸附心磷脂的方法制备的检测产品,具有较高的稳定性。

[0072] 此外,由于每个链霉亲和素能与4个生物素紧密结合,制得的改性心磷脂包被的纳米磁珠通过生物素-链霉亲和素放大效应,使被检测信号放大了4倍,极大的提高了抗磷脂抗体的检测灵敏度。

[0073] 以下为具体实施例。

[0074] 实施例1:改性心磷脂的制备

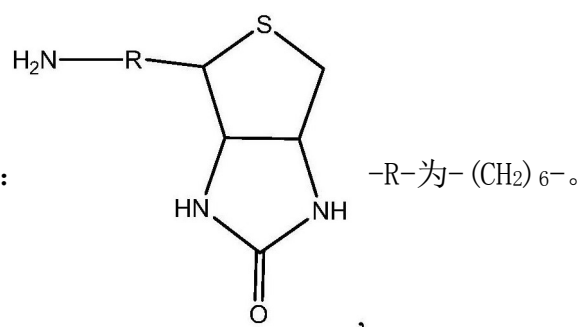
[0075] 将0.5mmol心磷脂溶于1mL无水甲苯中,加入1.5mmol的间氯过氧苯甲酸,搅拌中逐

渐加热升温至110℃,并维持该温度反应72小时。将反应液冷却至室温后,倒入25mL冰水中,再用20mL乙酸乙酯萃取溶液3次,合并乙酸乙酯。将合并的乙酸乙酯溶用10mL饱和氯化钠溶液洗涤1次后,加入无水硫酸钠干燥12小时。液负压下蒸干乙酸乙酯,残余的固体用少量甲醇溶解,过滤掉不溶物质,溶液用制备液相色谱纯化,得到约210mg无色油状液体即为改性心磷脂,MS (ESI⁺,m/z):1479.83131。

[0076] 实施例2:生物素衍生物结合的改性心磷脂的制备

[0077] 搅拌下往4mL无水DMF溶液中依次加入200mg环乙氧基改性心磷脂、110mg末端氨基化的生物素衍生物,室温下搅拌反应10小时。减压下蒸干反应液,残余固体用5mL乙酸乙酯溶解,过滤不溶物,并将所得的乙酸乙酯溶解蒸干,得到的白色固体即生物素衍生物结合的改性心磷脂。

[0078] 本实施例中,生物素衍生物的结构式为:



[0079] 本实施例制备的生物素衍生物结合的改性心磷脂不需要经过特别纯化即可用于后续的使用。

[0080] 实施例3:包被有改性心磷脂的链霉亲和素磁珠的制备

[0081] 取100μL含有0.2mg/mL的生物素衍生物结合的改性心磷脂的磷酸盐缓冲液,加入100μL含有10mg/mL的链霉亲和素磁珠,混匀后37℃孵育10分钟。磁分离后用1mL 30mM Tris缓冲液复溶,复溶所得的混合液震荡后再次磁分离,并将所得的固体用5mL 30mM Tris缓冲液复溶,得到浓度为0.02mg/mL的包被有改性心磷脂的链霉亲和素磁珠溶液。

[0082] 实施例4:包被有改性心磷脂的亲合素磁珠与抗磷脂样本反应

[0083] 分别取200μL实施例1~3中制备的包被有改性心磷脂的亲合素磁珠溶液,加入5μL抗磷脂抗体血清样本并于37℃孵育30分钟。磁分离后将包被有改性心磷脂的链霉亲和素磁珠复溶至200μL,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育30分钟后依次清洗、加入TMB底物液并孵育10分钟,再加入100μL终止液,10分钟内酶标仪上读取OD值,得到样本的发光信号值。

[0084] 分别取三个心磷脂阳性血清样本和三个心磷脂阴性血清样本,并且以传统的物理吸附法为对照,对比测得的OD值,得到下表1。

[0085] 表1:实施例1~3和对照组(物理吸附法)测量不同样本的OD值

[0086]

样本编号	阴性样本 1	阴性样本 2	阴性样本 3	阳性样本 1	阳性样本 2	阳性样本 3
实施例 1	51	63	101	1121	5702	3528
实施例 2	73	81	124	1576	6993	4367
实施例 3	65	71	117	1477	5982	4132
对照组	153	240	381	720	2155	2716

[0087] 由表1可以看出,实施例1~3制备的包被有改性心磷脂的亲合素磁珠与物理吸附法吸附的磁珠(对照组)在测试抗磷脂抗体样本时的发光信号比较,实施例1~3制备的包被有改性心磷脂的亲合素磁珠在测量阴性样本时发光信号值较对照组显著低(降低了1倍~4倍),同时实施例1~3制备的包被有改性心磷脂的亲合素磁珠在测量阳性样本时发光信号较对照组有极大的提高(提高了3~10倍)。

[0088] 由此说明,实施例1~3制备的包被有改性心磷脂的亲合素磁珠在测量抗磷脂样本时,相对于传统的物理吸附法的磁珠,检测灵敏度具有明显提升。

[0089] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

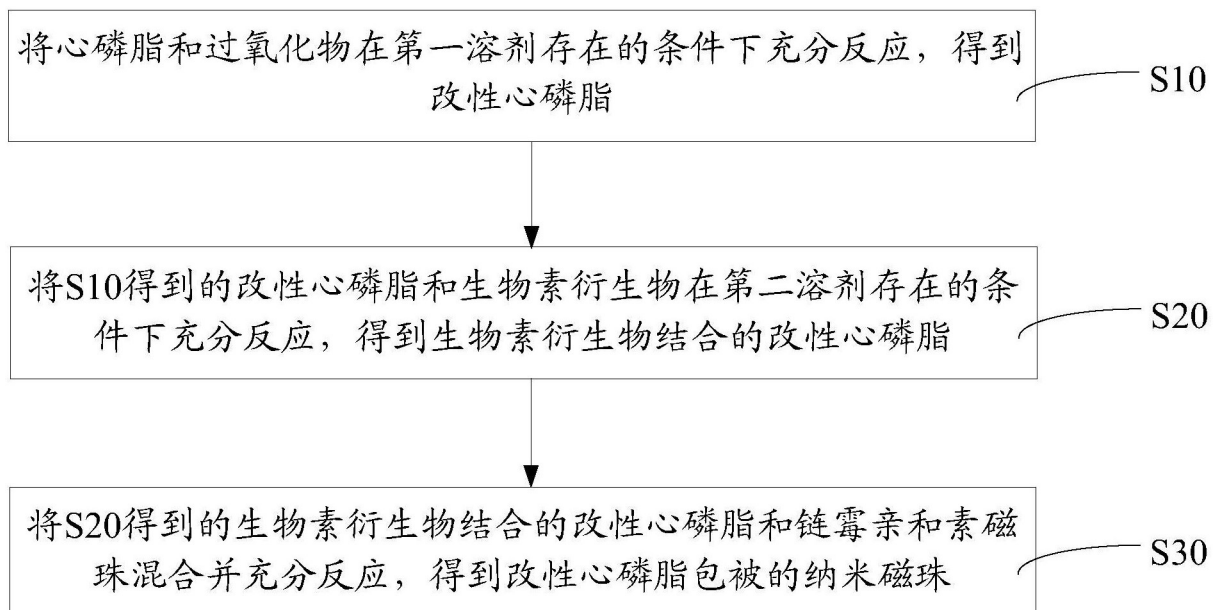


图1